

T 1/19/1

1/19/1 (Item 1 from file: 351)  
DIALOG(R) File 351: Derwent WPI  
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

003153559

WPI Acc No: 1981-14102D/198109

Multilayer analysis element has hydrophilic colloid contg. reagent - as a  
layer applied to transparent carrier on filter paper

Patent Assignee: KONISHIROKU PHOTO IND CO LTD (KONS )

Inventor: ISHII F; KAWAGUCHI Y; KISHI K; KOYAMA M; SAGAMIHARA K

Number of Countries: 002 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 3029301	A	19810219				198109 B
JP 56024576	A	19810309				198118

Priority Applications (No Type Date): JP 7999580 A 19790804

Abstract (Basic): DE 3029301 A

New multilayer element for carrying out analysis comprises (A) a  
light transmitting carrier coating, (B) at least one reagent layer  
located on the carrier layer, this reagent layer having (1) at least  
one reagent which reacts with the component contained in a flowable  
sample and (2) a hydrophilic colloidal substance. and (C) a fibrous and  
porous carrier layer on the side of the carrier coating.

Used in the analysis of liquid components, esp. body fluids.

Economical and simple to produce, Results can be evaluated using a  
spectrophotometer.

Title Terms: MULTILAYER; ANALYSE; ELEMENT; HYDROPHILIC; COLLOID; CONTAIN;  
REAGENT; LAYER; APPLY; TRANSPARENT; CARRY; FILTER; PAPER

Index Terms/Additional Words: GELATIN

Derwent Class: B04; J04; S03

International Patent Class (Additional): G01N-021/75; G01N-031/22;  
G01N-033/52

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-A06; B04-B04A; B04-B04D; B04-C02; B04-C03;

B05-A03A; B06-D15; B11-C07B; B12-K04; J04-B01

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E04E; S03-E14H9

Chemical Fragment Codes (M1):

\*11\* V800 V751 V752 V753 V754 V731 V732 V733 V734 V735 V711 V712 V713  
V714 V743 F423 G100 M531 L471 L472 L499 H211 J371 J372 J373 H401  
H481 J521 J231 J232 J221 J222 H602 M620 H721 M240 M232 M233 M331  
M333 M430 M510 M520 M521 M530 M540 P831 P832 M782 N101 R041 R042  
R043 R000 M423 M902

\*12\* V460 D932 J523 N100 M511 M520 M530 M540 M740 M750 P831 P832 M412  
M417 M424 M902

Chemical Fragment Codes (M2):

\*01\* J5 M320 M280 D932 J523 N100 M511 M520 M530 M540 M740 M750 P831 P832  
M412 M417 M424 M902

\*02\* K0 J6 H4 M315 M332 M321 M280 M344 M380 M391 L810 J451 J471 H482 H483  
H484 M620 N100 M510 M520 M530 M540 M740 M750 P831 P832 M416 M417  
M424 M902

\*03\* A940 C730 C108 C316 C803 C802 C805 C804 C801 C540 A429 M430 P831  
P832 M782 N101 R041 R042 R043 R000 M411 M902

\*04\* M282 M210 M211 M231 M240 M311 M320 E220 M430 M511 M520 M530 M540  
P831 P832 M782 N101 R041 R042 R043 R000 M412 M902

\*05\* H1 H5 M210 M211 M231 M270 M281 M311 M320 G100 M531 H141 H541 M640  
M430 M510 M520 M540 P831 P832 M782 N101 R041 R042 R043 R000 M414

M902  
\*06\* K0 H4 M320 M280 G221 M531 K431 K432 H401 H441 M630 M430 M510 M520  
M540 P831 P832 M782 N101 R041 R042 R043 R000 M414 M902  
\*07\* H1 H2 J5 M210 M211 M231 M240 M270 M281 M311 M320 F512 G100 M531 H121  
H212 H213 J521 M640 M430 M510 M521 M540 P831 P832 M782 N101 R041  
R042 R043 R000 M413 M902  
\*08\* H4 M313 M314 M332 M321 M280 M343 M380 M391 H482 H483 H484 M620 M430  
M510 M520 M530 M540 P831 P832 M782 N101 R041 R042 R043 R000 M416  
M902  
\*09\* H4 M320 M280 G221 M531 H442 H443 H444 M430 M510 M520 M540 P831 P832  
M782 N101 R041 R042 R043 R000 M414 M902  
Chemical Fragment Codes (M6):  
\*10\* R308 R309 R307 R510 R533 P831 P832 M902  
Ring Index Numbers: 03480  
?

⑤

①9 BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

G 01 N 33/52

DEUTSCHES PATENTAMT



BEST AVAILABLE COPY

DE 30 29 301 A

⑪

# Offenlegungsschrift 30 29 301

⑫

Aktenzeichen:

P 30 29 301.7

⑬

Anmeldetag:

1. 8. 80

⑭

Offenlegungstag:

19. 2. 81

⑳

Unionspriorität:

⑳ ㉑ ㉒

4. 8. 79 Japan P 99580-79

⑤4

Bezeichnung:

Mehrschichtig aufgebautes Element zur Durchführung von Analysen

⑦1

Anmelder:

Konishiroku Photo Industry Co., Ltd., Tokio

⑦4

Vertreter:

Henkel, G., Dr.phil.; Kern, R. M., Dipl.-Ing.; Feiler, L., Dr.rer.nat.;  
Hänzel, W., Dipl.-Ing.; Pat.-Anwälte, 8000 München

⑦2

Erfinder:

Kishi, Kenichi, Sagamihara, Kanagawa;  
Koyama, Mikio, Tokorozawa, Saitama; Kawaguchi, Yasushi, Musashino;  
Ishii, Fumio, Hino; Tokio (Japan)

DE 30 29 301 A 1

KONISEIROKU PHOTO INDUSTRY CO., LTD.,  
Tokio / JAPAN

---

Möhlstraße 37  
D-8000 München 80

Tel.: 089/98 20 85-87  
Telex: 05 29 802 hnkl d  
Telegramme: ellipsoid

PATENTANSPRÜCHE

- 1.) Mehrschichtig aufgebautes Element zur Durchführung von Analysen, gekennzeichnet durch
1. einen lichtdurchlässigen Schichtträger,
  2. mindestens eine auf dem Schichtträger befindliche Reagensschicht mit mindestens einem Reagens, das mit einer in einer fließfähigen Probe enthaltenen Komponente reagiert und einer hydrophilen kolloidalen Substanz und
  3. eine auf der dem Schichtträger entgegengesetzten Seite der Reagensschicht befindliche faserförmige und poröse Trägerschicht.
2. Element nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophile kolloidale Substanz aus Gelatine besteht.
3. Element nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die faserförmige und poröse Trägerschicht aus einem Filterpapier besteht.

Mehrschichtig aufgebautes Element zur Durch-  
führung von Analysen

Die Erfindung betrifft ein Element zum Analysieren flüssiger Komponenten, insbesondere ein solches, mit dessen Hilfe Körperflüssigkeiten, insbesondere quantitativ analysiert werden können.

Es gibt bereits Elemente zum Nachweis spezieller biochemischer Substanzen in Körperflüssigkeiten. Solche Elemente wurden auch bereits zu klinischen Testzwecken zum Einsatz gebracht. Bei Verwendung solcher Elemente wird von der Erscheinung Gebrauch gemacht, daß das mit dem jeweiligen Reagens gesättigte Element infolge Umsetzung mit der nachzuweisenden Substanz farbig wird. Weitverbreitet ist der Einsatz von Elementen zu Analysezwecken, bei denen ein Filterpapier mit dem jeweiligen Reagens gesättigt ist.

Aus den US-PSen 3 050 373 und 3 061 523 sind Elemente zu Analysezwecken bekannt, die durch Tränken einer faserförmigen und porösen Schicht, z.B. von Filterpapier, mit einer Reagenslösung und durch Trocknen derselben hergestellt wurden. Elemente dieses Typs arbeiten jedoch noch nicht völlig störungsfrei. Es hat auch nicht an Versuchen gefehlt, die verschiedensten Störungen während der Analyse zu beseitigen. So ist es beispielsweise aus der JP-OS 50-39558

bekannt, ein Filterpapier bis zur Sättigung mit einer Reagenslösung zu tränken und zu trocknen und danach das mit Reagens gesättigte Filterpapier in eine Äthylcelluloselösung zu tauchen und zu trocknen. Hierbei bildet sich eine semipermeable Membran aus, die eine Verunreinigung durch die überschüssige fließfähige Probe inhibiert bzw. die Wasserretention steuert. Aus der US-PS 3 802 842 wird der Schutz vor Verunreinigungen von Hand vorgenommen, indem auf ein mit Reagens gesättigtes Filterpapier ein feinsmaschiges Gewebe oder Tuch gelegt wird.

Elemente zu Analysenzwecken der beschriebenen Art sind sehr einfach handhabbar und liefern sofort Ergebnisse. Sie sind jedoch sehr oft ungleichmäßig gefärbt und bedingen dadurch eine Streuung der Analysenergebnisse, so daß sie in der Praxis nicht mit Sicherheit zur quantitativen, allenfalls qualitativen oder halbquantitativen Analyse herangezogen werden können. Der Grund dafür ist darin zu suchen, daß ein faserförmiges poröses Material, wie Filterpapier, nur unter Schwierigkeiten einen einheitlichen Aufbau erhält. Innerhalb der gleichen Herstellungscharge gibt es bei solchen Materialien eine beträchtliche Streuung in der Dicke, der Porengröße, der Oberflächenglätte und dergleichen. Diese Unterschiede verstärken sich zwischen verschiedenen Produktionschargen noch. Die Folge davon ist, daß üblicherweise die Reproduzierbarkeit von Testergebnissen bei Verwendung unterschiedlicher mit dem Reagens gesättigter faserförmiger poröser Materialien nicht gewährleistet ist. Dies ist insbesondere auf eine ungleichmäßige Verteilung des Reagens zurückzuführen. Bei Verwendung eines faserförmigen porösen Materials, wie Filterpapier, kommt es darüber hinaus auch noch zu einer starken und höchst ungleichmäßigen Wanderung der zu analysierenden Komponente oder eines reaktionsfähigen Reagenses in der Reagensschicht,

130008/0911

möglicherweise infolge eines chromatographischen Phänomens, wobei hohe lokale Reagenskonzentrationen zu beobachten sind.

Ein eine Einheit bildendes Element zu Analysezwecken entsprechend dem aus der US-PS 3 992 158 bekannten Element besitzt eine ähnliche Schichtstruktur wie das erfindungsgemäße Element. Anstelle faserförmiger Materialien wird auf eine auf einem lichtdurchlässigen Schichtträger befindliche Reagensschicht ein nichtfaserförmiges Material, z.B. ein verlaufendes Polymerisat und/oder ein Pigment, wie Titandioxid, appliziert. Ein solches Element ist hinsichtlich der auf das bisher verwendete faserförmige Material zurückzuführenden Ungleichmäßigkeit verbessert.

Es bereitet jedoch Schwierigkeiten, eine solche verlaufende Polymerisatschicht mit einem Pigment in ausreichender Stärke auf die Reagensschicht durch Verdampfen flüchtiger Komponenten aus dem Gemisch aus Lösungsmittel und Nicht-Lösungsmittel unter Einhaltung genau definierter Trocknungsbedingungen zur Gewährleistung einer geeigneten gleichmäßigen Porengröße zu applizieren. Darüber hinaus besitzt eine solche nichtfaserförmige Schicht, insbesondere wenn sie an Pigment hochkonzentriert ist, eine relativ große Strukturschwäche und wird darüber hinaus bei Ausbildung einer geeigneten Porenstruktur spröde. Insofern ist also ein solches Element zu Analysezwecken weder einfach herstellbar noch in der Praxis einfach zu handhaben, insbesondere wenn es in Stücke geschnitten wird.

Dieser Nachteil läßt sich erfindungsgemäß durch Verwendung von faserförmigen Materialien vermeiden, da Faserstrukturen selbst bei Anwesenheit von Pigmenten infolge Verflechtung der Einzelfasern recht fest sind.

Wie bereits erwähnt, wurden zu dem genannten Zweck bereits

130008/0911

faserförmige Materialien verwendet. Die faserförmigen porösen Materialien, die mit Reagentien direkt imprägniert werden, anhaftende Ungleichmäßigkeit läßt sich durch Trennen der faserförmigen porösen Schicht von der Reagensschicht und Tränken der faserförmigen Schicht mit einem oberflächenaktiven Mittel verbessern.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein mehrschichtiges Element zur Durchführung auch quantitativer Analysen zu schaffen, das sich ohne Schwierigkeiten auch durch angelernte Personen handhaben läßt, preisgünstig und einfach hergestellt werden kann und mit Hilfe eines Spektralphotometers quantitativ auswertbar ist.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein mehrschichtig aufgebautes Element zur Durchführung von Analysen, welches gekennzeichnet ist durch

1. einen lichtdurchlässigen Schichtträger,
2. mindestens eine auf dem Schichtträger befindliche Reagensschicht mit mindestens einem Reagens, das mit einer in einer fließfähigen Probe enthaltenen Komponente reagiert und einer hydrophilen kolloidalen Substanz und
3. eine auf der dem Schichtträger entgegengesetzten Seite der Reagensschicht befindliche faserförmige und poröse Trägerschicht.

In einer Reagensschicht des Elements gemäß der Erfindung ist ein sich von einem faserförmigen Medium, wie Filterpapier, unterscheidendes hydrophiles Kolloid als Medium gewählt. Folglich lassen sich bei der Herstellung des Elements das Reagens in der Reagensschicht gleichmäßig dispergieren und die Reagensschicht gleichmäßig auftragen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß sowohl der Reagensgehalt als auch



die Dicke der Reagensschicht einfach steuerbar sind.

Als lichtdurchlässiger Schichtträger eignet sich jeder beliebige Schichtträger, sofern er für ein fließfähiges Medium undurchdringlich ist. Beispiele für Schichtträger sind solche aus Celluloseacetat, Polyäthylenterephthalat, Polycarbonat und den verschiedensten Arten von Polymerisaten, wie Polystyrol und Polyvinylchlorid. Die Stärke des Schichtträgers kann sehr verschieden sein, zweckmäßigerweise beträgt sie 50 bis 250  $\mu\text{m}$ .

Die Reagensschicht kann auf den Schichtträger direkt aufgetragen werden. Andererseits kann durch Verbesserung der Haftung zwischen der Reagensschicht und dem Schichtträger erforderlichenfalls auch eine lichtdurchlässige Haftschrift vorgesehen werden. Die Reagensschicht muß ein Reagens enthalten, das durch Umsetzung mit der zu analysierenden Komponente eine Farbreaktion eingeht und dabei die Reagensschicht färbt. In der als Bindemittel verwendeten hydrophilen kolloidalen Substanz kann (können) ein Reagens (mehrere Reagentien) dispergiert bzw. gelöst werden. Als hydrophile kolloidale Substanzen eignen sich insbesondere natürlich vorkommende oder synthetische Substanzen, vorzugsweise Gelatine, Polyvinylalkohol und Polyvinylpyrrolidon. Eine besonders gut geeignete hydrophile kolloidale Substanz ist Gelatine.

Wenn das betreffende Medium einer Schicht aus einem faserförmigen porösen Träger benachbart aufgetragen wird, verringert sich das auf das faserförmige Medium zurückzuführende chromatographische Phänomen. Die Stärke der jeweiligen Schicht läßt sich ohne Schwierigkeiten genau steuern. Es können ohne weiteres Reagensdoppel- oder-dreifachschichten gebildet werden, da der Auftrag ohne Schwierigkeiten über die charakteristische Gelbildung bei etwa Raumtempera-

tur gesteuert werden kann. Weiterhin haften faserförmige und poröse Träger, wie Filterpapier, ohne Zuhilfenahme eines Bindemittels gut an der Gelatineschicht.

Das in der Reagensschicht jeweils unterzubringende spezielle Reagens hängt von der speziell zu analysierenden Komponente und der zur Identifizierung der betreffenden Komponente gewählten spezifischen Farbreaktion ab.

Es ist ferner möglich, die Komponenten zweier oder mehrerer Arten von Testproben innerhalb einer Reagensschicht reagieren zu lassen. Weiterhin kann eine Farbreaktion durch Trennen zweier oder mehrerer Arten von Reagentien in zwei oder mehreren Schichten herbeigeführt werden. In diesem Falle ist es erforderlich, daß die beiden bzw. mehreren speziellen Farbreaktionen einander nicht stören und die spektralphotometrischen Absorptionen der dabei gebildeten farbigen Substanzen einander nicht beeinträchtigen.

Auf der Seite der Reagensschicht, die dem Schichtträger gegenüberliegt, wird (werden) eine einzelne (mehrere) faserförmige und poröse Trägerschicht(en) angeordnet.

Der Träger kann dazu dienen, daß

1. eine gegebene Menge einer Testprobe über eine gegebene Fläche verteilt wird;
2. das die Farbreaktion störende Material in der Testprobe entfernt wird und
3. das durch den Schichtträger bei Durchführung einer spektralphotometrischen Analyse hindurchtretende Licht reflektiert wird.

Folglich besitzt ein erfindungsgemäßes Element zur Durchführung von Analysen neben dem Schichtträger mindestens zwei

Schichten, von denen die eine die Reagensschicht bildet und die andere diejenige Schicht darstellt, die die genannten drei Funktionen ausübt. Darüber hinaus kann jede der einzelnen Schichten auch eine der genannten Funktionen übernehmen. Schließlich können zwei der drei Funktionen in einer Schicht und die restliche Funktion in der anderen Schicht erfüllt werden. Ferner können mehrere Schichten zur Übernahme einer dieser Funktionen vorgesehen werden.

Ein faserförmiger und poröser Träger kann auf einer Reagensschicht durch Belegen der aufgetragenen Reagensschicht vor dem Trocknen fixiert werden.

Bei einem mehrschichtig ausgebildeten erfindungsgemäßen Element zu Analysenzwecken wird eine zu analysierende fließfähige Testprobe, z.B. eine Blutprobe, auf die von der Schichtträgerseite her die äußerste Schicht bildende faserförmige und poröse Trägerschicht aufgetropft bzw. aufgebracht.

Die farbige Fläche bzw. der farbige Bezirk der Reagensschicht hängt von der auf das zu Analysenzwecken verwendete Element aufgebrachten Probenmenge ab. Die Farbdichte wird hierdurch jedoch nicht merklich beeinflusst. Durch geeignete Wahl des Porenraums des faserförmigen und porösen Trägers lassen sich die charakteristischen Wasserabsorptions- bzw. -quellungseigenschaften der Reagensschicht variieren. Die bevorzugte Porengröße (durchschnittlicher Lochdurchmesser) beträgt zweckmäßigerweise 0,7 bis 10, vorzugsweise 1 bis 7  $\mu$ , bei einer scheinbaren Dichte von zweckmäßigerweise 0,2 bis 0,6, vorzugsweise 0,35 bis 0,5  $\text{g/cm}^3$ . In einem solchen Falle läßt sich das Quellungsverhältnis (d.h. die Diczunahme) der Reagensschicht den jeweiligen Gegebenheiten angepaßt von etwa 150 bis 500 % variieren. Darüber hinaus nimmt die faserförmige und poröse Trägerschicht keine solche Maschen-

struktur an, wie sie der aus der US-PS 3 802 842 bekannte Prüfling aufweist. Vielmehr ist die offene Oberfläche des Lochs praktisch Null.

Wenn der durchschnittliche Lochdurchmesser über  $10\ \mu$  liegt, werden in Blut enthaltene Blutzellen und sonstige Bestandteile nicht filtriert und erreichen die Grenzschicht der Reagensschicht. Hierdurch erhöht sich nicht nur die Hintergrunddichte bei der spektralphotometrischen Analyse, sondern es wird auch die Farbreaktion zwischen Reagens und der zu analysierenden speziellen Komponente einer Testprobe beeinträchtigt. Wenn andererseits der durchschnittliche Lochdurchmesser unter  $0,7\ \mu$  liegt, wird eine glatte Zufuhr von im Blut enthaltenen Seren verhindert, so daß eine korrekte Analyse unmöglich durchgeführt werden kann.

Wenn die spektralphotometrische Analyse durch Lichtreflexion von der Schichtträgerseite des zu Analysenzwecken dienenden Elements gemäß der Erfindung her durchgeführt wird, kann zur Sicherstellung eines geeigneten Hintergrunds der faserförmigen und porösen Trägerschicht ein weißes Pigment einverleibt oder eine getrennte, ein weißes Pigment enthaltende Schicht vorgesehen werden. Vorzugsweise wird eine ein weißes Pigment enthaltende Schicht zwischen der faserförmigen und porösen Trägerschicht und der Reagensschicht vorgesehen.

Bevorzugte Beispiele für solche weiße Pigmente sind Titan-dioxid, Bariumsulfat, Diatomeenerde, geweißte feine Polymerisatkörnchen und Glas.

Vorzugsweise wird der Trägerschicht auch ein feinpulverisiertes Ionenaustauscherharz oder feinpulverisiertes Kaolin einverleibt. Auf diese Weise können in Seren enthaltene hochmolekulare Proteine unter Verbesserung der Zuverlässigkeit der Analysenergebnisse adsorbiert werden.

Weiterhin ist es von Vorteil, der Trägerschicht ein oberflächenaktives Mittel, beispielsweise ein anionisches, kationisches oder nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel, einzuverleiben. Bevorzugt verwendbare nicht-ionische oberflächenaktive Mittel sind 2,5-Di-tert.-butylphenoxypolyäthylenglykol, p-Octylphenoxypolyglycidyläther, p-Isononylphenoxypolyäthylenglykol u.dgl.. Hierbei handelt es sich um Polyalkylenglykolderivate alkylsubstituierter Phenole und Polyalkylenglykole höherer Fettsäuren. Diese oberflächenaktive Mittel steuern die Vordringgeschwindigkeit einer fließfähigen Probe und wirken gleichzeitig dahingehend, daß das unerwünschte chromatographische Phänomen wirksam inhibiert wird. Darüber hinaus hindern die nicht-ionischen oberflächenaktiven Mittel das im Blut enthaltene Protein an einer Diffusion in die Reagensschicht.

Beispiele für erfindungsgemäß einsetzbare faserförmige und poröse Träger sind Filterpapier, Kunstpapier, Gewirke oder Gespinste u.dgl.. Als Rohmaterialien zu ihrer Herstellung eignen sich sogen. fibrinöse Substanzen, wie Cellulose und Celluloseacetat, und Filterpapiere aus Derivaten solcher fibrinöser Substanzen, halbsynthetische Filterpapiere oder Kunstpapiere aus synthetischen Fasern, wie Polyäthylen, Polyamid, Polypropylen u.dgl. sowie Gewirke oder Gespinste, ferner Glasfaserpapiere aus Glasfasern u.dgl.. Bevorzugte faserförmige und poröse Träger sind Kunstpapiere und Filterpapiere aus den genannten Kunstfasern, insbesondere Filterpapiere.

Die Stärke der faserförmigen porösen Trägerschicht kann je nach dem beabsichtigten Gebrauchszweck beliebig variiert werden. Sie reicht zweckmäßigerweise von etwa 10 bis etwa 500, vorzugsweise von etwa 150 bis 300  $\mu$ .

Erfindungsgemäß kann man auch noch weitere Schichten als die

genannten vorsehen. So ist es beispielsweise möglich, auf der Oberseite der Reagensschicht oder der obersten mehrerer Reagensschichten eine Dialysierschicht aus einer semipermeablen Substanz anzuordnen. Die Dialysierschicht dient zur Analyse von in Blut enthaltener Glukose oder von Harnstoffstickstoff. Die Dialysierschicht gestattet nämlich bei der Glukoseanalyse ein Vordringen der Glukose zu der Reagensschicht, sie hindert jedoch hochmolekulares Protein, das die Reaktionen inhibiert, an einem Durchtritt. Bei der Analyse von Harnstoffstickstoff dient die Dialysierschicht zur Eliminierung des Einflusses von atmosphärischem Kohlendioxid.

Verwendbare semipermeable Substanzen sind beispielsweise Cellophancollodium, entnitrifiziertes Collodium, Gelcellophan, Äthylcellulose u.dgl..

Ein mehrschichtig aufgebautes erfindungsgemäßes Element zur Durchführung von Analysen kann durch geeignete Wahl des Testreagenses für eine Analyse der verschiedensten Arten von Substanzen sowie von Blutkomponenten, wie Glukose, Albumin, Harnstoffstickstoff, Bilirubin, Ammoniak, Harnsäure, Cholesterin, Triglyceriden, Serum, Glutaminsäure/Oxal-essigsäure-Transaminase, Lactatdehydrogenase, Milchsäure, Kreatinin, Amylase, Chlorid und Calcium, ausgestaltet werden.

Wenn beispielsweise Glukose analysiert werden soll, läßt sich die Glukosemenge durch Einarbeiten eines Ferricyanids in die Reagensschicht und durch Ermittlung einer Abnahme der Gelbfärbung des Ferricyanids infolge Reaktion des Ferricyanids mit der Glukose bestimmen.

Dasselbe erreicht man auch, indem man in der Reagensschicht mehrere Arten von Reagentien unterbringt.

So können beispielsweise in der Reagensschicht ein Glukose hydrolysierendes Enzym (Glukoseoxidase), Peroxidase, 4-Aminoantipyrin-hydrochlorid und 7-Hydroxy-1-naphthol untergebracht werden. Die Glukose wird durch Glukoseoxidase zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid zersetzt. Danach wird das Wasserstoffperoxid durch Peroxidase zersetzt. Gleichzeitig erfolgt eine Kupplung des 4-Aminoantipyrin-hydrochlorids mit 7-Hydroxy-1-naphthol unter Farbstoffbildung. Durch Ermittlung der gebildeten Farbdichte läßt sich die Glukosemenge bestimmen.

Da bei einem erfindungsgemäßen Element nahezu kein chromatographisches Phänomen auftritt, läßt sich mit Hilfe eines üblichen Spektralphotometers ohne Schwierigkeiten eine quantitative Analyse durchführen.

Die mit Hilfe eines Spektralphotometers durchgeführte spektralphotometrische Analyse umfaßt in der Regel eine Messung der sichtbaren Absorption des Produkts. Man kann sich jedoch auch anderer Arten von spektralphotometrischer Analyse, z.B. der fluorymetrischen Analyse, bedienen. Die gewählten Analysenverfahren hängen von der Strahlung des jeweiligen Produkts und dem Hintergrund ab. Neben sichtbarer Strahlung kann man sich auch einer sonstigen Strahlung, z.B. einer UV- oder IR-Strahlung bedienen.

Die mit Hilfe eines mehrschichtig aufgebauten, zu Analyse-zwecken dienenden Elements gemäß der Erfindung zu analysierenden Testproben, z.B. Blutproben, werden zunächst dahingehend aufgearbeitet, daß Blutzellen u.dgl. von den Seren mit einer Zentrifuge abgetrennt werden. Danach werden die zentrifugierten Seren in geeigneter Menge auf das zu Analyse-zwecken dienende Element aufgebracht.

Die zu analysierende Probe braucht jedoch nicht in jedem Falle

in der geschilderten Weise aufgearbeitet zu werden. Es kann nämlich auch zu analysierendes Vollblut direkt auf das zu Analysenzwecken dienende Element aufgebracht werden, wobei Blutzellen u.dgl. aufgrund der Filterwirkung des faserförmigen und porösen Trägers ausfiltriert und lediglich die Seren zu der Reagensschicht vordringen gelassen werden. Selbst wenn auf dem zu Analysenzwecken dienenden Element noch Seren vorhanden sind, wird dadurch die spektralphotometrische Analyse nicht beeinträchtigt.

Die zur Analyse erforderliche Menge an Testproben ist extrem gering. Sie beträgt allgemein etwa 5 bis 50, zweckmäßigerweise 5 bis 20, vorzugsweise 10  $\mu$ l.

Es ist auch möglich, einen Teil des Reagenses oder das gesamte Reagens, der bzw. das vermutlich in der Reagensschicht enthalten ist, dem zu Analysenzwecken dienenden Element durch Tränken, Aufsprühen oder Verstreichen nach dem Eindringen der zu analysierenden Komponenten in die Reagensschicht zuzuführen.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher veranschaulichen.

#### B e i s p i e l      1

Zunächst werden drei verschiedene durchsichtige Polyäthylenterephthalatfilme mit einer Haftschrift mit, pro  $m^2$  Trägerfläche 8,3 g (Trockengewicht) Gelatine beschichtet. Der Prüfling I wird nach dem Auftragen der Gelatine lediglich getrocknet. Auf den Prüfling II wird mit geringem Druck unmittelbar nach dem Auftragen und Erstarren der Gelatineschicht ein handelsübliches Filterpapier zum Haften gebracht. Der Prüfling III wird dadurch hergestellt, daß ein weiterer Prüfling II mit einer wäßrigen Lösung von p-Nonyl-



phenoxypolyäthylenoxid besprüht und dann getrocknet wird. Als Vergleichsprüfling A dient lediglich das Filterpapier (Stärke: 0,21 mm; scheinbare Dichte:  $0,48 \text{ g/cm}^3$ ). Als Vergleichsprüfling B dient ein mit der wässrigen Lösung von Nonylphenoxypolyäthylenoxid besprühtes Filterpapier.

Auf die verschiedenen Prüflinge und Vergleichsprüflinge werden jeweils 10 µl handelsüblicher grüner Tinte (wässrige Lösung blauer und gelber Farbstoffe) aufgetropft, worauf deren Verhalten verfolgt wird. Nach viermaligem Auftropfen der Tinte werden die in der folgenden Tabelle I angegebenen Ergebnisse erhalten.

TABELLE I

Vergleichsprüfling bzw. Prüfling	Fleckdurchmesser in mm				Auftreten eines chromatographischen Phänomens
	1	2	3	4	
Vergleichsprüfling A	13	16	12	13	Ja, in starken Maße (es bildet sich ein äußerer gelber Farbstoffring)
Vergleichsprüfling B	15	14	13	13	weniger als bei Vergleichsprüfling A
Prüfling I	-	-	-	-	*
Prüfling II	10	11,5	12	11	weit weniger als bei Vergleichsprüfling B
Prüfling III	10	10,5	10,5	10	kaum

\*bei dem Prüfling I verändert sich die Tropfengröße nicht, die Absorption der Tinte verläuft sehr langsam

Aus Tabelle I geht hervor, daß man nur erfindungsgemäß (Prüfling II und III) den Fleckdurchmesser konstant halten und das chromatographische Phänomen weitestgehend zurückdrängen kann.

B e i s p i e l      2

Durch Auftragen von Kupfersulfat und einer Neocuproin enthaltenden Gelatinelösung auf einen mit einer Haftschrift versehenen durchsichtigen Polyäthylenterephthalatfilm wird eine Reagensschicht gebildet. Pro  $\text{m}^2$  Trägerfläche betragen die Mengen an den genannten Bestandteilen: 36 mg Kupfersulfat, 130 mg Neocuproin und 5,5 g Gelatine. Auf die gebildete Reagensschicht wird sofort unter geringem Druck ein handelsübliches kalandriertes Filterpapier zum Haften gebracht. Schließlich wird auf das Filterpapier eine wäßrige Lösung von 2,4-Di-tert.-butylphenoxypolyglycidyläther aufgesprüht. Hierbei erhält man ein zum Analysieren von Harnsäure geeignetes Element.

Werden auf das zum Analysieren dienende Element 10  $\mu\text{l}$  harnsäurehaltiges Standardserum aufgetropft, erscheint ein rosafarbener Fleck eines Durchmessers von 11 mm. Mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Elements läßt sich somit Harnsäure im Serum bestimmen.

B e i s p i e l      3

Zur Ausbildung einer Reagensschicht wird auf einen mit einer Haftschrift versehenen durchsichtigen Polyäthylenterephthalatfilm eine Glukoseoxidase, Peroxidase und o-Anisidinhydrochlorid enthaltende wäßrige Gelatinelösung aufgetragen. Die Auftragsmengen an den verschiedenen Bestandteilen betragen pro  $\text{m}^2$  Trägerfläche: 320 mg Glukoseoxidase, 400 mg Peroxidase, 450 mg o-Dianisidinhydrochlorid und 22 g Gelatine. Auf die gebildete Reagensschicht wird sofort unter geringem Druck ein handelsübliches Filterpapier einer Stärke von 0,19 mm und einer scheinbaren Dichte von  $0,37 \text{ g/cm}^3$  zum Haften gebracht. Schließlich wird das Filterpapier mit einer wäßrigen Lösung von p-Nonylphenoxy-

polyglycidyläther besprüht. Hierbei erhält man ein zum Analysieren von Glukose geeignetes Element.

Auf das zu Analysenzwecken verwendbare Element werden jeweils 10 µl Standardserum bzw. glukosehaltiges Standardserum aufgetropft. Eine Untersuchung zeigt, daß letzteres zu einer dunkleren braunen Farbentwicklung führt als ersteres. Daraus geht hervor, daß ein zur Glukoseanalyse herangezogenes erfindungsgemäßes Element eine Glukosebestimmung im Blut ermöglicht.

#### B e i s p i e l      4

Auf einem mit einer Haftschrift versehenen durchsichtigen Polyäthylenterephthalatfilm werden durch Auftragen einer Beschichtungsflüssigkeit pro m<sup>2</sup> Trägerfläche aufgetragen:

Gelatine	22 g
1-Naphtholsulfonsäure, Natriumsalz	1,08 g
4-Aminoantipyrinhydrochlorid	0,54 g
Glycerin	2,15 g
Peroxidase	7000 Einheiten
Glukoseoxidase	6900 Einheiten
2,5-Di-tert.-butylphenoxy- polyäthylenglykol	0,40 g

Auf der gebildeten Reagensschicht wird sofort unter geringem Druck ein handelsübliches Filterpapier zum Haften gebracht. Das Filterpapier wird mit einer wäßrigen Lösung von 2,5-Di-tert.-butylphenoxy-polyäthylenglykol besprüht, worauf das Ganze gesäubert und getrocknet wird. Hierbei erhält man ein zur Glukoseanalyse geeignetes Element.

Auf das erhaltene Element zu Analysenzwecken werden 10 µl 0,4%iger Glukoselösung bzw. 10 µl eines 0,4 % Glukose ent-

haltenden künstlichen Serums aufgetropft, worauf die Reflexionsdichte der in beiden Fällen gebildeten Farbstoffe bei 510 nm in bestimmten Zeitintervallen von der Seite des durchsichtigen Schichtträgers her bestimmt wird. Die Ergebnisse finden sich in der folgenden Tabelle II:

TABELLE II

	<u>1 Mi- nute später</u>	<u>2 Mi- nuten später</u>	<u>3 Mi- nuten später</u>	<u>5 Mi- nuten später</u>	<u>6 Mi- nuten später</u>	<u>8 Mi- nuten später</u>	<u>9 Mi- nuten später</u>
Glukose- lösung	0,75	1,13	1,42	1,60	1,67	1,68	1,69
künstliches Serum	0,72	1,09	1,40	1,60	1,63	1,65	1,68

Aus Tabelle II geht hervor, daß die Meßergebnisse in beiden Fällen übereinstimmen und daß die Umsetzungen im wesentlichen nach 7 Minuten abgeschlossen sind.

Die Reflexionsdichte ergibt sich durch Abziehen eines Blindwerts (die dem zu Analysenzwecken herangezogenen Element innewohnende Farbdichte) von der gemessenen Dichte.

B e i s p i e l      5

Durch Auftragen einer Beschichtungsflüssigkeit auf einen mit einer Haftschrift versehenen durchsichtigen Polyäthylen-terephthalatfilm erhält man eine Reagenslösung mit, jeweils

bezogen auf 1 m<sup>2</sup> Trägerfläche, folgenden Menge an Einzelbestandteilen:

Gelatine	11 g
1,7-Dihydroxynaphthalin	0,50 g
4-Aminoantipyrin	0,50 g
Glycerin	1,50 g
Peroxidase	3500 Einheiten
Glukoseoxidase	3500 Einheiten
2,5-Di-tert.-amylphenoxypolyglycidol	0,40 g
Lauroxypolyäthylenglykol	0,32 g
Dimedon	0,11 g

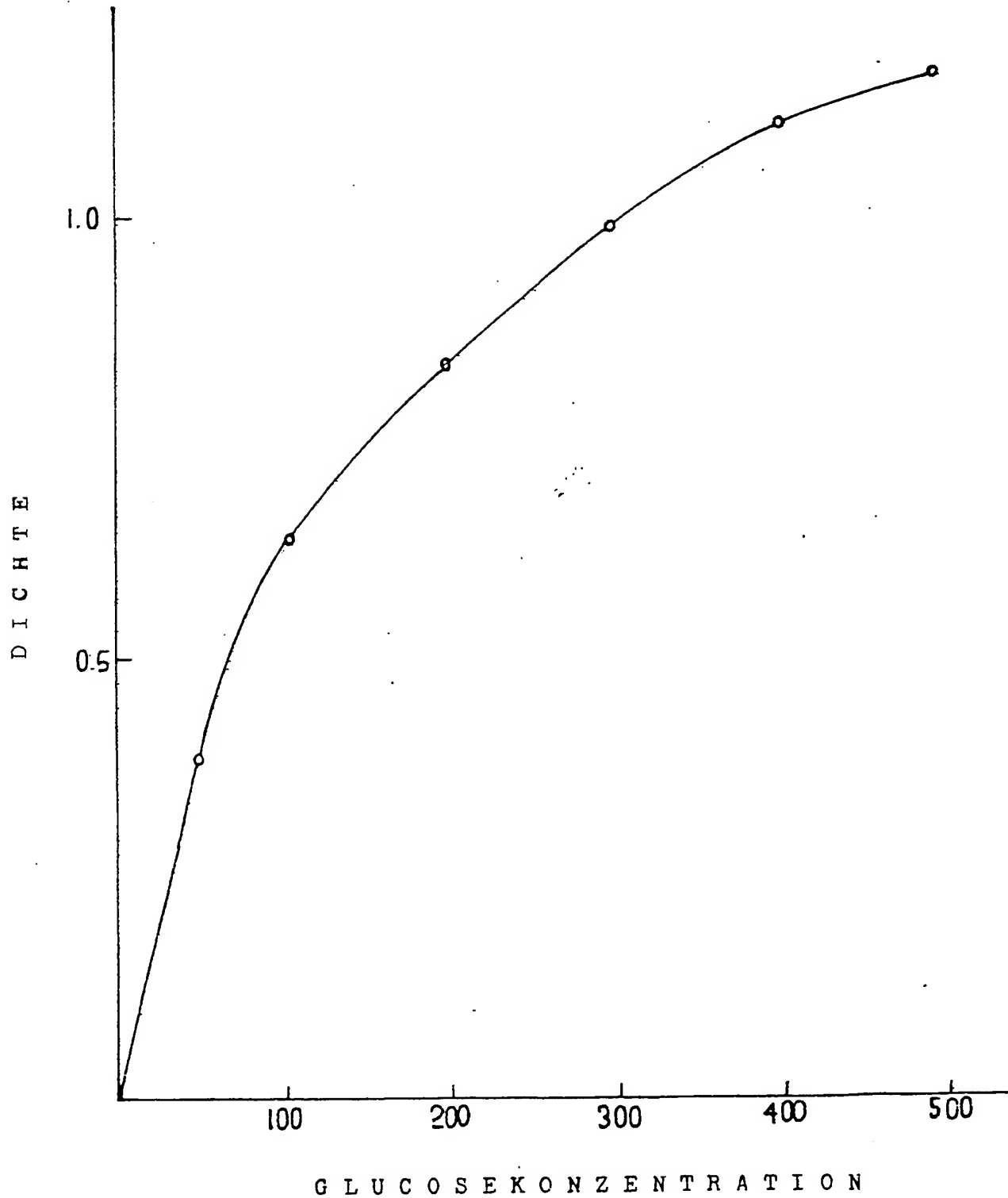
Nach 1-minütigem Liegenlassen in 3°C kalter Luft wird auf die gebildete Reagensschicht sofort ein handelsübliches Filterpapier, das vorher mit einer wäßrigen Lösung von 2,5-Di-tert.-butylphenoxypolyäthylenglykol besprüht und getrocknet worden war, unter geringem Druck zum Haften gebracht.

Auf das trockene Element wird eine Reihe von Glukoselösungen (jeweils in einer Menge von 10 µl) mit, jeweils pro dl, 50, 100, 200, 300, 400 bzw. 500 mg Glukose aufgetropft. Nach 10 min werden die Reflexionsdichtewerte von der Seite des durchsichtigen Schichtträgers her bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Figur graphisch dargestellt. Aus der Kurve ergibt sich, daß das zu Analysenzwecke dienende Element gemäß der Erfindung eine quantitative Bestimmung ermöglicht.

---

-19-  
3029301

Nummer:	30 29 301
Int. Cl.2:	G 01 N 21/75
Anmeldetag:	1. August 1980
Offenlegungstag:	19. Februar 1981



130008/0911